

## ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ТА УЛЬТРАЗВУКУ ПРИ ОТРИМАННІ ЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ НА ЇХ ЗДАТНІСТЬ ЗМІНЮВАТИ БАЛАНС ВІЛЬНОЇ ТА ЗВ'ЯЗАНОЇ ВОДИ В СУСПЕНЗІЯХ ЕРИТРОЦИТІВ

**В. М. Кучков<sup>1</sup>, О. А. Горобченко<sup>2</sup>, О. А. Нардід<sup>1</sup>, О. Т. Ніколов<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, вул. Переяславська, 23, Харків, 61015, Україна

<sup>2</sup> Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, пл. Свободи, 4, Харків, 61022, Україна

Екстракти плаценти людини (ЕПЛ) завдяки вмісту комплексу біологічно активних сполук використовуються у сучасній медичній практиці переважно як засоби, що прискорюють загоєння ран різного генезу [0]. Залежно від методу отримання виділяють водні та водно-спиртові ЕПЛ. Водна екстракція дозволяє вилучити більше полярних молекул (пептидів, амінокислот, нуклеотидів, та ін.), ніж спиртова [0]. Тому, саме водні ЕПЛ виступають у якості потужного біогенного стимулятора [0]. Нажаль, виготовлення цих препаратів потребує тривалого часу та підтримання особливих умов зберігання. Серед сучасних рішень цієї проблеми слід відмітити використання ультразвуку у якості каталізатора процесу екстрагування та застосування низьких температур як способу довгострокового збереження препаратів. Такі удосконалення дозволили значно скоротити час приготування ЕПЛ та, у випадку їх заморожування до  $-196^{\circ}\text{C}$ , досягти необмежених термінів зберігання. Однак, наслідки таких прикладів оптимізації процесу отримання та збереження ЕПЛ не досліджені у обсязі, достатньому для впровадження у повсякденну медичну практику.

Цілковита залежність терапевтичної ефективності ЕПЛ від методу отримання, їх зволожувальні властивості, особливо важливі у терапії захворювань шкіри [0], а також неминучий контакт з еритроцитами під час аплікації цих препаратів на рану обумовили основні завдання нашого дослідження. Метою останнього була оцінка впливу ЕПЛ на баланс вільної та зв'язаної води в суспензіях еритроцитів людини в залежності від методу виготовлення екстрактів та способу зберігання плаценти.

В експерименті використовували еритроцити А(ІІ) групи крові резус-позитивних здорових чоловіків віком від 20 до 35 років. Екстрагування проводили шляхом 12-годинної експозиції свіжоотриманої (ЕПЛсв) та кріоконсервованої при  $-196^{\circ}\text{C}$  (ЕПЛкр) плаценти людини у фізіологічному розчині, а також інкубуванням у тому ж середовищі під дією ультразвуку (ЕПЛсв-уз і ЕПЛкр-уз). Еритроцити обробляли ЕПЛ упродовж 2-х годин, а потім відмивали у фізіологічному розчині. Кількість еритроцитів у 1 мкл суспензії визначали за допомогою камери Горяєва за стандартною методикою.

Баланс вільної та зв'язаної води в суспензіях еритроцитів оцінювали методом НВЧ-діелектрометрії. Дійсну ( $\epsilon'$ ) та уявну ( $\epsilon''$ ) частини комплексної діелектричної проникності (КДП) зразків визначали за допомогою НВЧ-діелектрометра резонансного типу на частоті 9,2 ГГц [0]. Значення статичної діелектричної проникності ( $\epsilon_s$ ) і частоти діелектричної релаксації ( $f_d$ ) молекул води отримували з рівнянь Дебая [0], вважаючи, що релаксація молекул води у зразках суспензій еритроцитів має дебайвський характер. Питому електропровідність ( $\sigma$ ) визначали за допомогою моста змінного струму на частоті 1 кГц з використанням комірки з платиновими електродами [0].

Визначені діелектричні характеристики досліджуваних зразків коливалися поблизу контрольних, що свідчить про незначні відхилення гідратного стану еритроцитів від норми. Достовірної різниці у КДП зразків, що зазнали впливу ЕПЛ, отриманих з та без використання ультразвуку, не виявлено. Проте, у порівнянні з контролем відмічено тенденцію до зниження значень  $\epsilon'$  та  $\epsilon''$  для суспензій еритроцитів, оброблених ЕПЛсв та ЕПЛсв-уз. У випадку інкубування клітин з ЕПЛкр та ЕПЛкр-уз спостерігалась зворотна картина. З огляду на те, що кількість еритроцитів у 1 мкл зразків залишалася незмінною (у межах похибки експерименту),  $\epsilon'$  розглядали як показник, що переважно та прямо пропорційно залежить від долі вільної води в суспензіях клітин. Різниця у вимірних значеннях  $\epsilon''$  для усіх зразків обумовлена наявністю відмінностей у їх електролітному складі (діелектричні втрати за механізмом іонної провідності) та вмісті біологічних макромолекул (втрати на обертання диполів води).

Вимірні значення КДП не дають інформації щодо пертурбацій у сітці водневих зв'язків, результатом яких є зміна долі вільної води в системі. Доповненням, але не вичерпним рішенням цієї проблеми, є визначення частоти дипольної релаксації молекул води  $f_d$  та статичної діелектричної проникності  $\epsilon_s$ , яка враховує як  $\epsilon'$ , так і  $\epsilon''$ . Значення  $\epsilon_s$  пропорційне кількості вільної води у зразку при постійній концентрації розчиненої або суспендованої речовини.

Як відомо, в біологічних рідинах, де розчинником є вода,  $f_d$  визначається вірогідністю утворення водневих зв'язків між молекулами вільної води. Зміна середньої кількості цих зв'язків на одну молекулу води свідчить про молекулярні перебудови в досліджуваній системі. Звідси видно, що величина  $f_d$  характеризує рухливість молекул води у НВЧ полі, отже, може слугувати мірою їх взаємодії з оточенням.

Розрахунок  $\epsilon_s$  і  $f_d$  для зразків еритроцитів, що зазнали впливу ЕПЛ, отриманих з та без використання ультразвуку, не виявила достовірної різниці у значеннях  $f_d$ . В той же час, у порівнянні з контролем відмічено тенденцію до зниження значення  $\epsilon_s$  для суспензій еритроцитів, оброблених ЕПЛсв, і збільшення у випадку інкубування клітин з ЕПЛкр та ЕПЛкр-уз. Зроблено припущення, що перше є наслідком збільшення кількості гідратної води навколо еритроцитів у деяких донорів, друге свідчить про дегідратацію еритроцитів.

У зв'язку з тим, що досліджувана біологічна система містила сильні електроліти, визначення КДП та  $\epsilon_s$  проводили з урахуванням питомої електропровідності ( $\sigma$ ). Знайдені значення  $\sigma$  суспензій еритроцитів з ЕПЛ, що були отримані без застосування ультразвуку, перевищували контрольні показники. Таку ситуацію пов'язували як із частковим гемолізом клітин у процесі вимірювання, так і з виходом у позаклітинне середовище електролітів та низькомолекулярних речовин в результаті дії екстрактів плаценти. Достовірної різниці між  $\sigma$  зразків, оброблених ЕПЛсв-уз та ЕПЛкр-уз, не виявлено. Слід відзначити, що  $\sigma$  останніх наближалася до контрольного значення, що

вказує, щонайменше, на відсутність негативного впливу ЕПЛ, отриманих за допомогою ультразвуку, порівняно з ЕПЛсв та ЕПЛкр.

На основі отриманих результатів зроблено висновок, що використання ультразвуку для скорочення часу отримання ЕПЛ не впливає (у межах похибки вимірювань) на їх здатність змінювати баланс вільної і зв'язаної води в суспензіях еритроцитів людини. Виявлено, що така оптимізація не призводить до достовірних змін у аналогічних властивостях екстрактів, отриманих із кріоконсервованої плаценти людини.

#### *Література*

1. *Cho H.-R.* The effects of placental extract on fibroblast proliferation / [ Cho Hee-Ryung, Ryou Ji-Ho, Lee Jin-Woo, Lee Mu-Hyoung] // J. Cosmet. Science. – 2008. Vol. 59. – pp. 195 – 202.
2. *Ansari K. U.* An experimental and clinical evaluation of immunomodulating potential of human placental extracts / K. U. Ansari, N. Gupta, S. K. Bapat // Indian J. Pharmacol. – 1994. – Vol. 26. – pp. 130 – 132.
3. *Wu C. H.* Wound healing effects of porcine placental extracts on rats with thermal injury / [ C. H. Wu, G. Y. Chang, W. C. Chang et al.] // Br. J. Dermatol. – 2003. – Vol. 148. – pp. 236 – 245.
4. *Vicenta L.* Dermatological Diseases and Human Placental Extracts Psoriasis Case Study in Europe / L. Vicenta, L. Tomas, B. Jesus // Approaches To Aging Control. – 2013. – Vol. 17. – pp. 91 – 97.
5. *Hackl E. V.* Using UHF-dielectrometry to study protein structural transitions / E. V. Hackl, S. V. Gatash, O. T. Nikolov // J. Biochem. Biophys. Meth. – 2005. – V. 63, № 2. – P. 137–148.
6. *Лопатин Б. А.* Теоретические основы электрохимических методов анализа: учеб. пособие для ун-тов / Б. А. Лопатин. – М.: Высшая школа, 1975. – 295 с.